

Docket No.: 43888-129

SAM
#3
8-19-02

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of

Motokazu WATANABE, et al.

Serial No.: 10/084937

Filed: March 01, 2002

For: BIOSENSOR AND METHOD OF SUBSTRATE QUANTIFICATION

Group Art Unit: 1743

Examiner: Noguerola



**CLAIM OF PRIORITY AND
TRANSMITTAL OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT**

Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

Sir:

In accordance with the provisions of 35 U.S.C. 119, Applicant hereby claims the priority of:

Japanese Patent Application Number 2001-063083, Filed March 7, 2001

cited in the Declaration of the present application. A Certified copy is submitted herewith.

Respectfully submitted,

MCDERMOTT, WILL & EMERY

Michael E. Fogarty
Registration No. 36,139

600 13th Street, N.W.
Washington, DC 20005-3096
(202) 756-8000 MEF:kjw
Date: March 1, 2002
Facsimile: (202) 756-8087

日本国特許
JAPAN PATENT OFFICE

43888-129
MOTOYASU WATANABE, ET AL
March 1 2002
Dermott, Will & Emery

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office



出願年月日
Date of Application:

2001年 3月 7日

出願番号
Application Number:

特願2001-063083

[ST.10/C]:

[JP2001-063083]

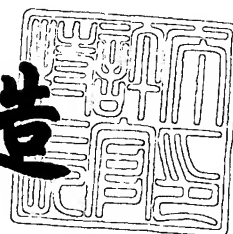
出願人
Applicant(s):

松下電器産業株式会社

2002年 1月18日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3116430

【書類名】 特許願

【整理番号】 2032630004

【提出日】 平成13年 3月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 31/00

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 渡邊 基一

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 長谷川 美和

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 山本 智浩

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 吉岡 俊彦

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 南海 史朗

【特許出願人】

【識別番号】 000005821

【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100097445

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩橋 文雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100103355

【弁理士】

【氏名又は名称】 坂口 智康

【選任した代理人】

【識別番号】 100109667

【弁理士】

【氏名又は名称】 内藤 浩樹

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011305

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9809938

【書類名】 明細書

【発明の名称】 バイオセンサ、基質の定量方法およびそれに用いる酵素試薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 絶縁性の基板上に形成された測定極と対極とを含む電極系、前記電極系上に形成された親水性高分子層、および前記基板上に設けられ、前記基板上に試料供給路および試料供給口を形成するカバー部材を含むバイオセンサであって、前記試料供給路内にコレステロール酸化酵素、コレステロールエステラーゼ、電子メディエータ、および pH 緩衝剤を含み、前記 pH 緩衝剤の pH が酸性であることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項 2】 前記 pH 緩衝剤が、コハク酸、コハク酸塩、D-酒石酸、クエン酸、フタル酸、フタル酸塩、trans-アクリチニン酸、ギ酸、3,3-ジメチルグルタル酸、フェニル酢酸ナトリウム、酢酸、酢酸塩、カコジル酸ナトリウム、マレイン酸、マレイン酸塩、リン酸、リン酸塩、イミダゾール、2,4,6-トリメチルピリジン、トリエタノールアミン、Tris、MES、ADA、PIPES、ACES、BES、MOPS、TES、HEPES、クロロ酢酸からなる群より選択されることを特徴とする、請求項 1 記載のバイオセンサ。

【請求項 3】 前記 pH 緩衝剤の pH が 4 ~ 6.5 であることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載のバイオセンサ。

【請求項 4】 前記 pH 緩衝剤の添加量が $1 \sim 200 \text{ nmol/mm}^2$ であることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のバイオセンサ。

【請求項 5】 前記コレステロール酸化酵素および前記コレステロールエステラーゼと、前記電子メディエータとが互いに離れて担持されていることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のバイオセンサ。

【請求項 6】 前記 pH 緩衝剤が、前記コレステロール酸化酵素または前記コレステロールエステラーゼと混合して担持されていることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のバイオセンサ。

【請求項 7】 前記 pH 緩衝剤が、前記電子メディエータと混合して担持されていることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のバイオセンサ。

【請求項 8】 前記 pH 緩衝剤が、前記コレステロール酸化酵素、前記コレス

テロールエステラーゼおよび前記電子メディエータから離れて担持されており、かつ前記試料供給路内において、前記コレステロール酸化酵素、前記コレステロールエステラーゼおよび前記電子メディエータよりも前記試料供給口に近い位置に担持されていることを特徴とする、請求項1～5のいずれかに記載のバイオセンサ。

【請求項9】 絶縁性の基板上に形成された測定極と対極とを含む電極系、前記電極系上に形成された親水性高分子層、前記基板上に設けられ、前記基板上に試料供給路および試料供給口を形成するカバー部材、および前記試料供給路内にコレステロール酸化酵素および電子メディエータを含むバイオセンサを用いる基質の定量方法であって、pHが酸性であるpH緩衝剤と測定試料とを混合する前処理工程、前記前処理工程により得られた溶液を前記バイオセンサに供給する工程、および前記バイオセンサによって前記測定試料中の基質の定量を行う工程を含むことを特徴とする基質の定量方法。

【請求項10】 pHが酸性であるpH緩衝剤および酵素を含み、請求項1～8のいずれかに記載のバイオセンサに用いる酵素試薬であって、前記酵素がコレステロール酸化酵素またはコレステロールエステラーゼであることを特徴とする酵素試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試料中の特定成分を迅速かつ簡便に定量することができるバイオセンサ、基質の定量方法およびそれに用いる酵素試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来から、試料液の希釈や攪拌などを行うことなく試料液中の特定成分を簡易に定量する方式として、様々なバイオセンサが提案されている。バイオセンサの一例として、例えば次のようなセンサが知られている（特開2000-39416号公報参照）。

【0003】

このバイオセンサは、絶縁性基板上にスクリーン印刷などの方法で測定極、対極および参照極からなる電極系を形成し、この電極系上に接して酸化酵素と電子メディエータとを含む酵素反応層を形成することによって作製される。

【0004】

このバイオセンサの酵素反応層上に基質を含む試料液を滴下すると、酵素反応層が溶解して酵素と基質が反応し、これにともなって電子メディエータが還元される。酵素反応終了後、還元された電子メディエータを電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求めることができる。

【0005】

この従来のバイオセンサでは、血液、血漿、または血清等の試料液中のコレステロール濃度を測定するため、エステル型コレステロールを脱エステル化するコレステロールエステラーゼと、遊離型コレステロールを酸化するコレステロール酸化酵素であるコレステロールオキシダーゼの2種類の酵素を含む。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、血液、血漿、または血清等の測定試料は、中性付近にpH緩衝能を有するため、コレステロール酸化酵素およびコレステロールエステラーゼを含むバイオセンサにとって、必ずしも好ましいpH条件ではなかった。

【0007】

本発明は、このような問題点に鑑み、コレステロール酸化酵素およびコレステロールエステラーゼを含むバイオセンサの至適pHおよび好ましいpH緩衝剤を明確にして、高い応答性を有する高性能なバイオセンサを提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明によるバイオセンサは、絶縁性の基板上に形成された測定極と対極とを含む電極系、前記電極系上に形成された親水性高分子層、および前記基板上に設けられ、前記基板上に試料供給路および試料供給口を形成するカバー部材を含むバイオセンサであって、前記試料供給路内にコレステロール酸化酵素、コレステ

ロールエステラーゼ、電子メディエータ、および pH 緩衝剤を含み、前記 pH 緩衝剤の pH が酸性であることを特徴とする。

【 0 0 0 9 】

また、本発明による基質の定量方法は、絶縁性の基板上に形成された測定極と対極とを含む電極系、前記電極系上に形成された親水性高分子層、前記基板上に設けられ、前記基板上に試料供給路および試料供給口を形成するカバー部材、および前記試料供給路内にコレステロール酸化酵素および電子メディエータを含むバイオセンサを用いる基質の定量方法であって、pH が酸性である pH 緩衝剤と測定試料とを混合する前処理工程、前記前処理工程により得られた溶液を前記バイオセンサに供給する工程、および前記バイオセンサによって前記測定試料中の基質の定量を行う工程を含むことを特徴とする。

【 0 0 1 0 】

また、本発明による酵素試薬は、pH が酸性である pH 緩衝剤および酵素を含み、前記本発明のバイオセンサに用いる酵素試薬であって、前記酵素がコレステロール酸化酵素またはコレステロールエステラーゼであることを特徴とする。

【 0 0 1 1 】

【発明の実施の形態】

本発明によるバイオセンサは、絶縁性の基板上に形成された測定極と対極とを含む電極系、前記電極系上に形成された親水性高分子層、および前記基板上に設けられ、前記基板上に試料供給路および試料供給口を形成するカバー部材を含むバイオセンサであって、前記試料供給路内にコレステロール酸化酵素、コレステロールエステラーゼ、電子メディエータ、および pH 緩衝剤を含み、前記 pH 緩衝剤の pH が酸性であることを特徴とする。

【 0 0 1 2 】

このようにすると、pH 緩衝剤を含む層が平滑化されるので、測定試料液供給時に気泡が混入することを防ぐことができるとともに、試料供給路内の体積または高さを減少することができるため試料液の微量化が実現される。また、pH 緩衝剤の pH が酸性であるので、測定試料液として中性付近に緩衝能を有する血液、血漿、または血清等を用いた場合にも、pH 緩衝剤が反応系の pH を酸性に調

製することで、酵素の反応性を向上させ、センサの応答性を向上することができる。そのため、基質濃度が高濃度であっても、一定時間内に十分な応答値が得られるので、測定時間が短縮できる。また、センサ応答性の向上に伴うS/N比向上、すなわち測定精度向上が可能である。

【0013】

ここでpH緩衝剤が、コハク酸、コハク酸塩、D-酒石酸、クエン酸、フタル酸、フタル酸塩、trans-アクチニン酸、ギ酸、3,3-ジメチルグルタル酸、フェニル酢酸ナトリウム、酢酸、酢酸塩、カコジル酸ナトリウム、マレイン酸、マレイン酸塩、リン酸、リン酸塩、イミダゾール、2,4,6-トリメチルピリジン、トリエタノールアミン、Tris、MES、ADA、PIPES、ACES、BES、MOPS、TES、HEPES、クロロ酢酸からなる群より選択されることが好ましい。

【0014】

ここで、Trisはトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、MESは2-モルホリノエタンスルホン酸、ADAはN-(2-アセトアミド)イミノジアセト酢酸、PIPESはピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)、ACESはN-2-(アセトアミド)-2-アミノエタノールスルホン酸、BESはN,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸、MOPSは3-モルホリノプロパンスルホン酸、TESはN-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸、HEPESはN-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸のそれぞれ略称である。

【0015】

この中で、溶解性が十分高いという観点から、コハク酸塩としてはコハク酸カリウム、コハク酸ナトリウム等が好ましく、リン酸塩としてはリン酸一水素二カリウム、リン酸二水素一カリウム、リン酸一水素二ナトリウム、リン酸二水素一ナトリウム等が好ましく、酢酸塩としては酢酸カリウム、酢酸ナトリウム等が好ましく、フタル酸塩としては、フタル酸水素カリウム、フタル酸ナトリウム、フタル酸カリウム等が好ましく、マレイン酸塩としては、マレイン酸水素ナトリウム、マレイン酸カリウム、マレイン酸ナトリウムが好ましい。コハク酸、コハク

酸塩、リン酸、リン酸塩、マレイン酸、マレイン酸塩、フタル酸、フタル酸塩を用いると、特に応答値の向上が著しく、直線応答性に優れたバイオセンサが得られるのでさらに好ましい。

【0016】

さらに、上記 pH 緩衝剤は水に溶解しやすいので、試料液を添加した際、pH 緩衝剤を含む層は直ちに試料液に溶解し、酵素反応と電極反応を円滑に進めることができるので都合がよい。

【0017】

また、上記 pH 緩衝剤は、必要に応じて塩酸、酢酸などの酸や、NaOH、KOH などのアルカリによって、所定の pH に調製してバイオセンサの試料供給路内に添加すればよい。

【0018】

応答直線性の向上、および一定時間内において十分高い応答値を得るという観点から、好適な pH は、4～6.5 である。さらに好ましい pH は、4～5.5 である。

【0019】

また、測定試料が緩衝作用を有する場合もあるため、同時に2種類以上の pH 緩衝剤をバイオセンサに添加してもよい。pH 緩衝剤の組み合わせとしては、コハク酸とマレイン酸の混合物、コハク酸とリン酸の混合物、マレイン酸と Tris の混合物等が好ましい。

【0020】

上記 pH 緩衝剤の添加量は、試料液として血液 0.1～5 μ l を測定対象とする使い捨てタイプのセンサでは、pH 緩衝剤を含む層の効果的な平滑化、およびブランク値の低減化という観点から、1～200 nmol/mm² の範囲であることが好ましい。このとき、好ましい酵素量は、コレステロールエステラーゼが 0.01～2.5 U/mm²、コレステロール酸化酵素が 0.01～1 U/mm² である。

【0021】

また、前記コレステロール酸化酵素および前記コレステロールエステラーゼと

、前記電子メディエータとが互いに離れて担持されていることが好ましい。このようにすると、基質濃度が0の測定試料（例えば、水）に対する応答値（以下ブランク値と呼ぶ）が低いバイオセンサが得られる。さらに、保存による応答値増加が防止されるので、保存特性に優れたバイオセンサが得られる。

【0022】

また、前記pH緩衝剤が、前記コレステロール酸化酵素または前記コレステロールエステラーゼと混合して担持されていてもよい。このようにすると、前記コレステロール酸化酵素または前記コレステロールエステラーゼを含む層が平滑化されるので、測定試料供給時に気泡が混入することを防ぐことができる。

【0023】

また、前記pH緩衝剤が、前記電子メディエータと混合して担持されていてもよい。このようにすると、電子メディエータを含む層が平滑化されるので、測定試料供給時に気泡が混入することを防ぐことができる。

【0024】

また、前記pH緩衝剤が、前記コレステロール酸化酵素、前記コレステロールエステラーゼおよび前記電子メディエータから離れて担持されており、かつ前記試料供給路内において、前記コレステロール酸化酵素、前記コレステロールエステラーゼおよび前記電子メディエータよりも前記試料供給口に近い位置に担持されていてもよい。このようにすると、バイオセンサに供給された測定試料がまずpH緩衝剤を溶解することで、測定試料のpHがすみやかに酸性側に調製されるという効果を有する。

【0025】

本発明による基質の定量方法は、絶縁性の基板上に形成された測定極と対極とを含む電極系、前記電極系上に形成された親水性高分子層、前記基板上に設けられ、前記基板上に試料供給路および試料供給口を形成するカバー部材、および前記試料供給路内にコレステロール酸化酵素および電子メディエータを含むバイオセンサを用いる基質の定量方法であって、pHが酸性であるpH緩衝剤と測定試料とを混合する前処理工程、前記前処理工程により得られた溶液を前記バイオセンサに供給する工程、および前記バイオセンサによって前記測定試料中の基質の

定量を行う工程を含むことを特徴とする。このようにすると、前記前処理工程によって、測定試料のpHがすみやかに酸性側に調製されるので、酵素の反応性を向上し、センサの応答性を向上することができる。

【0026】

また、本発明による酵素試薬は、pHが酸性であるpH緩衝剤および酵素を含み、上記本発明のバイオセンサに用いる酵素試薬であって、前記酵素がコレステロール酸化酵素またはコレステロールエステラーゼであることを特徴とする。このようにすると、前記酵素試薬をバイオセンサに添加するだけで、応答性が向上したバイオセンサが得られる。

【0027】

本発明による基質の定量方法または酵素試薬におけるpH緩衝剤は、コハク酸、コハク酸塩、D-酒石酸、クエン酸、フタル酸、フタル酸塩、trans-アクチニン酸、ギ酸、3,3-ジメチルグルタル酸、フェニル酢酸ナトリウム、酢酸、酢酸塩、カコジル酸ナトリウム、マレイン酸、マレイン酸塩、リン酸、リン酸塩、イミダゾール、2,4,6-トリメチルピリジン、トリエタノールアミン、Tris、MES、ADA、PIPES、ACES、BES、MOPS、TES、HEPES、クロロ酢酸からなる群より選択されることが好ましい。

【0028】

本発明においてコレステロール酸化酵素としては、コレステロールオキシダーゼおよびコレステロールデヒドロゲナーゼがあげられる。

【0029】

電子メディエータとしては、フェリシアン化カリウム、p-ベンゾキノンおよびその誘導体、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセンおよびその誘導体などを用いることができる。中でも、空気中において安定な酸化還元を行うことができるフェリシアン化カリウムが好ましい。

【0030】

親水性高分子は、電極系表面または基板表面から、コレステロール酸化酵素、コレステロールエステラーゼ、電子メディエータ、pH緩衝剤等の試薬を含む試薬層の剥離を防ぐことができる。さらに、親水性高分子は、前記試薬層表面の割

れを防ぐ効果も有しており、バイオセンサの信頼性を高めるのに効果的である。このような親水性高分子としては、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリリジンなどのポリアミノ酸、ポリスチレンスルホン酸、ゼラチンおよびその誘導体、アクリル酸およびその塩の重合体、メタクリル酸およびその塩の重合体、スターチおよびその誘導体、無水マレイン酸およびその塩の重合体、アガロースゲルおよびその誘導体あげられる。特に、十分な粘度が得られることから、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、およびポリビニルピロリドンが好ましい。

【0031】

【実施例】

以下に、実施例を用いて本発明を説明するが、本発明はこれらのみに限定されるものではない。

【0032】

(実施例1)

図1に、本発明のバイオセンサにおいてpHが酸性であるpH緩衝剤を用いることの効果を実証するために用いた、バイオセンサの斜視図を示す。ポリエチレンテレフタレートからなる電気絶縁性の基板1上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷し、リード2および3を形成している。ついで、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを基板1上に印刷して測定極4を形成している。この測定極4は、リード2と接触している。さらに、この基板1上に、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層6を形成している。絶縁層6は、測定極4の外周部を覆っており、これにより測定極4の露出部分の面積を一定に保っている。そして、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストをリード3と接触するように基板1上に印刷してリング状の対極5を形成し、測定極4および対極5からなる電極系を形成している。

【0033】

コレステロール酸化酵素およびコレステロールエステラーゼを用いたバイオセ

ンサの至適 pH、および好ましい pH 緩衝剤を明確にするため、上記バイオセンサを用いて以下の実験を行った。

【0034】

コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、および1種類の pH 緩衝剤を含む水溶液を調製した。次に、フェリシアン化カリウム、および Triton X-100 を含む水溶液を調製した。測定試料としてヒト血清を用いた。pH 緩衝剤として、コハク酸、マレイン酸、リン酸、Tris の中から1種類選択した。

【0035】

上記三溶液をチューブ内で攪拌、混合した。このとき、血清中に含まれるエステル型コレステロールは、コレステロールエステラーゼによって、脱エステル化される。また、脱エステル化されたコレステロール、および初めから血清に含まれるコレステロールは、コレステロールオキシダーゼによって酸化される。同時に、溶液中のフェリシアン化カリウムがフェロシアン化カリウムに還元される。

【0036】

次に、上記三溶液の混合液を図1に示す電極系上に $10\mu\text{l}$ (マイクロリットル) 滴下した。三溶液を混合して20秒後に、対極を基準として測定極に500 mV の電圧を印加した。このとき、溶液中に含まれるフェロシアン化イオンが酸化され、測定極と対極の間に電流が流れる。電圧を印加して5秒後に測定極および対極間を流れる電流値を応答値とした。最後に、血清が pH 緩衝能を有するため、三溶液混合後の pH を実測した。

【0037】

第一に、pH 緩衝剤の一例としてマレイン酸を用いた。種々の総コレステロール濃度に調製された血清に対して電流応答値を測定し、横軸に総コレステロール濃度、縦軸に電流応答値をプロットしてセンサの応答特性図を作成した。その結果を図2に示す。その結果、pH が酸性である場合により応答値が高く、よりよい直線応答性が得られた。また、pH が酸性である場合、一定時間内に応答直線性が得られることから、酸性の pH 緩衝剤の添加によって、測定時間の短縮を実現できた。

【 0 0 3 8 】

第二に、pH緩衝剤の一例としてコハク酸を用いた。種々の総コレステロール濃度に調製された血清に対して電流応答値を測定し、横軸に総コレステロール濃度、縦軸に電流応答値をプロットしてセンサの応答特性図を作成した。その結果を図3に示す。その結果、pH4または5のいずれの場合にも応答値が高く、よりよい応答直線性が得られた。また、応答直線の傾き向上によるS/N比向上、すなわち測定精度の向上が望める。

【 0 0 3 9 】

第三に、コハク酸、マレイン酸、リン酸、T r i sを添加したときの結果を図4に示す。種々の総コレステロール濃度に調製された血清に対して電流応答値を測定し、横軸に混合後のpH、縦軸に電流応答値をプロットしてセンサのpH依存性を明らかにした。その結果、混合液のpHを中性、またはアルカリ性に調製した場合よりも、酸性に調製した場合に、より高い応答値が得られることが明らかになった。最適なpHは、4～6.5であり、さらに好ましくは、4～5.5であった。

【 0 0 4 0 】

本実験で用いた酵素の至適pHは、コレステロールエステラーゼがpH6.5以下、コレステロールオキシダーゼがpH7付近であった。よって、本結果は、コレステロールエステラーゼの至適pHにより近いpHに、バイオセンサのpHを調節することで、より高い応答値が得られることを示している。

【 0 0 4 1 】

(実施例2)

次に、図5および図6を用いて本発明の実施例2を説明する。図5は、本実施例におけるバイオセンサの分解斜視図である。図1と同様の電極系をまず用意した。後述のように各試薬層を形成した後、図5の一点鎖線で示すような位置関係をもって接着することにより、バイオセンサが作製される。カバー部材である中カバー10のスリット部分に試料供給路が形成される。センサの端部におけるスリットの開放端部は、試料供給路への試料供給口12となる。また、上カバー11には空気孔13が形成されている。

【 0 0 4 2 】

図 6 は、同バイオセンサの要部縦断面図である。図 1 と同様の電極系を形成した基板 1 上に、親水性高分子の一種であるカルボキシメチルセルロース (CMC) 層 7 を作製した。CMC 層 7 上に、pH 緩衝剤の一種であるコハク酸と、電子メディエータの一種であるフェリシアン化カリウムを含む電子メディエータ・pH 緩衝剤層 8 を形成した。電子メディエータ・pH 緩衝剤層 8 の作製方法は以下の通りである。まず、pH 5 に調製したコハク酸緩衝液にフェリシアン化カリウムを溶解した。次に、このフェリシアン化カリウムを含むコハク酸緩衝液を、CMC 層 7 上に滴下後、50℃において 15 分間乾燥した。

【 0 0 4 3 】

一方、試料供給路内の上カバー 11 側には、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、界面活性剤として Triton X-100 およびコール酸ナトリウムを含む水溶液を滴下後に凍結乾燥することで、酵素・界面活性剤層 9 を形成した。

【 0 0 4 4 】

本実施例では、測定試料がセンサ内に導入されると、電子メディエータ・pH 緩衝剤層 8 に含まれるコハク酸が溶解して、センサ内の溶液の pH を酸性側に調製する。そのため、酵素の活性が向上して、センサの応答性が向上する効果が得られる。そして、一定時間内に十分な応答が得られるので、測定時間が短縮されるという効果が得られる。また、電子メディエータ・pH 緩衝剤層 8 に含まれるコハク酸が、電子メディエータ・pH 緩衝剤層 8 自体を平滑化するので、電極系上への気泡の混入を防止するという効果を有する。さらに、酵素と電子メディエータとが互いに離れて担持されているので、ブランク値が低いバイオセンサが得られる。さらに、酵素と電子メディエータとが互いに離れて担持されているので、保存による応答値増加が防止され、保存特性に優れたバイオセンサが得られる。

【 0 0 4 5 】

なお、バイオセンサ内における酵素、またはフェリシアン化カリウムの担持位置は、本発明の効果を損なわない限り、種々の位置に配置することができる。例

えば、フェリシアン化カリウムは、試料供給路内のCMC層7上以外の場所にも配置することができる。

【0046】

なお、本実施例では、界面活性剤としてTriton X-100およびコール酸ナトリウムを用いたが、他のオクチルチオグルコシド、Lubrol、コール酸、デオキシコール酸ナトリウム、ジギトニン、ドデシルマルトシド、シュクロースモノラウレート、タウロデオキシコール酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-p-tert-オクチルフェニルエーテル等の界面活性剤を用いてもよい。

【0047】

なお、酵素反応に伴い還元された電子メディエータを酸化する電流の測定方法としては、測定極と対極のみの二電極方式と、さらに参照極を加えた三電極方式の両方の方式が可能である。

【0048】

(実施例3)

次に図7を用いて、本発明の実施例3を説明する。図7は、本実施例におけるバイオセンサの要部縦断面図である。図1と同様の電極系を形成した基板1上に、親水性高分子の一種であるCMC層7を作製した。次に、pH5に調製したマレイン酸緩衝液に、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、フェリシアン化カリウム、Triton X-100、およびコール酸ナトリウムの水溶液を、CMC層7上に滴下して凍結乾燥することで酵素・界面活性剤・電子メディエータ・pH緩衝剤層14を形成した。

【0049】

本実施例では、CMC以外の全ての試薬を一度に滴下乾燥するので、作製方法が最も容易であるという利点を有する。また、測定試料がセンサ内に導入されると、酵素・界面活性剤・電子メディエータ・pH緩衝剤層14に含まれるマレイン酸が溶解して、センサ内の溶液のpHを酸性側に調製する。そのため、酵素の活性が向上して、センサの応答性が向上する効果が得られる。

【0050】

(実施例4)

次に図 8 を用いて、本発明の実施例 4 を説明する。図 8 は、本実施例におけるバイオセンサの要部縦断面図である。図 1 と同様の電極系を形成した基板 1 上に、親水性高分子の一種である CMC 層 7 を作製した。CMC 層 7 上に、T r i t o n X - 1 0 0、コール酸ナトリウム、およびフェリシアン化カリウムを含む水溶液を滴下後、5 0℃において 1 5 分間乾燥して、界面活性剤・電子メディエータ層 1 5 を作製した。

【 0 0 5 1 】

一方、試料供給路内の上カバー 1 1 側には、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、および p H 緩衝剤の一種であるリン酸を含む水溶液を滴下後に凍結乾燥することで酵素・p H 緩衝剤層 1 6 を形成した。

【 0 0 5 2 】

本実施例では、測定試料がセンサ内に導入されると、酵素・p H 緩衝剤層 1 6 に含まれるリン酸が溶解して、センサ内の溶液の p H を酸性側に調製する。そのため、酵素の活性が向上して、センサの応答性が向上する効果が得られる。また、酵素・p H 緩衝剤層 1 6 に含まれるリン酸が、酵素・p H 緩衝剤層 1 6 自体を平滑化するので、電極系上への気泡の混入を防止するという効果を有する。さらに、酵素と電子メディエータとが互いに離れて担持されているので、ブランク値が低く、保存による応答値増加が防止されることにより保存特性に優れたバイオセンサが得られる。

【 0 0 5 3 】

(実施例 5)

次に図 9 および図 1 0 を用いて、本発明の実施例 5 を説明する。図 9 は、本実施例におけるバイオセンサの一部試薬構成を省略した分解斜視図である。また、図 1 0 は、同バイオセンサの要部断面図である。図 1 と同様の電極系を形成した基板 1 上に、親水性高分子の一種である CMC 層 7 を作製した。CMC 層 7 上に、フェリシアン化カリウムの水溶液を滴下後、5 0℃において 1 5 分間乾燥し、電子メディエータ層 1 7 を作製した。

【 0 0 5 4 】

一方、試料供給路内の上カバー 1 1 側には、コレステロールエステラーゼ、コ

レステロールオキシダーゼ、界面活性剤としてTriton X-100、およびコール酸ナトリウムを含む水溶液を滴下後に凍結乾燥することで酵素・界面活性剤層18を形成した。さらに、試薬供給路内において、酵素・界面活性剤層18の上流には、測定試料に含まれる固体成分を濾過するためのフィルター19を設けた。例えば、測定試料が血液である場合には、その血球が濾過される。フィルター19としては、ガラスフィルター、濾紙、セルロース繊維等が用いられる。基板1、中カバー10、および上カバー11を一点鎖線で示す位置関係で接着した際に、フィルター19は基板1表面と接触部20において接する。また、基板1上のセンサ端部は、試料供給路への試料供給口12となる。pH緩衝剤であるコハク酸は、酵素・界面活性剤層18および電子メディエータ層17より上流側に位置するフィルター19内に含有させた。コハク酸の含有方法としては、フィルター19を所定の位置に配置後、コハク酸の水溶液をフィルター19に滴下して、凍結乾燥を行った。

【0055】

本実施例では、試料供給路内において、コハク酸が、酵素およびフェリシアン化カリウムより上流に位置するので、測定試料がまずコハク酸を溶解することで、測定試料のpHが速やかに酸性側に調製されるという効果を有する。そのため、バイオセンサ内における酵素の活性が向上して、センサの応答性が向上する効果が得られる。

【0056】

【発明の効果】

以上のように本発明によれば、pH緩衝剤を添加してバイオセンサ内のpHを酸性側に調製することで、バイオセンサの応答値を向上することができ、より良好な直線応答性が得られる。また、一定時間内に十分高い応答値が得られることから、測定時間の短縮を実現することができる。さらに、pH緩衝剤がpH緩衝剤を含む試薬層を平滑化するので、測定試料供給時に気泡が混入することを防ぐことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明のバイオセンサにおいて pH が酸性である pH 緩衝剤を用いることの効果を実証するために用いた、バイオセンサの斜視図

【図 2】

同バイオセンサにおいて pH 緩衝剤としてマレイン酸を用いた場合の応答特性図

【図 3】

同バイオセンサにおいて pH 緩衝剤としてコハク酸を用いた場合の応答特性図

【図 4】

同バイオセンサにおいて各種 pH 緩衝剤を添加した場合の応答特性図

【図 5】

本発明の一実施例におけるバイオセンサの分解斜視図

【図 6】

同バイオセンサの要部縦断面図

【図 7】

本発明の他の実施例におけるバイオセンサの要部縦断面図

【図 8】

本発明のさらに他の実施例におけるバイオセンサの要部縦断面図

【図 9】

本発明のさらに他の実施例におけるバイオセンサの一部試薬構成を省略した分解斜視図

【図 10】

同バイオセンサの要部縦断面図

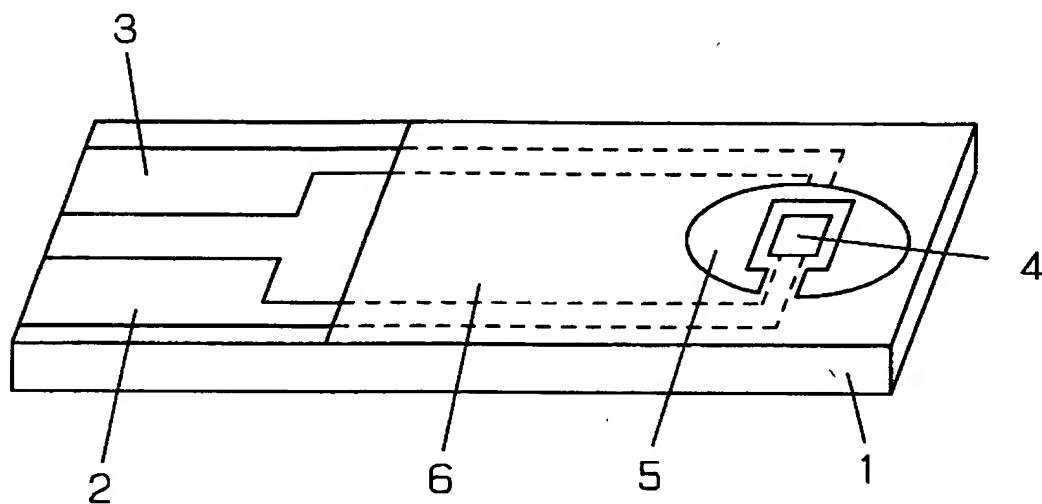
【符号の説明】

- 1 基板
- 2, 3 リード
- 4 測定極
- 5 対極
- 6 絶縁層
- 7 CMC 層

- 8 電子メデイエータ・pH緩衝剤層
- 9 酵素・界面活性剤層
- 10 中カバー
- 11 上カバー
- 12 試料供給口
- 13 空気孔
- 14 酵素・界面活性剤・電子メデイエータ・pH緩衝剤層
- 15 界面活性剤・電子メデイエータ層
- 16 酵素・pH緩衝剤層
- 17 電子メデイエータ層
- 18 酵素・界面活性剤層
- 19 フィルター
- 20 接触部

【書類名】 図面

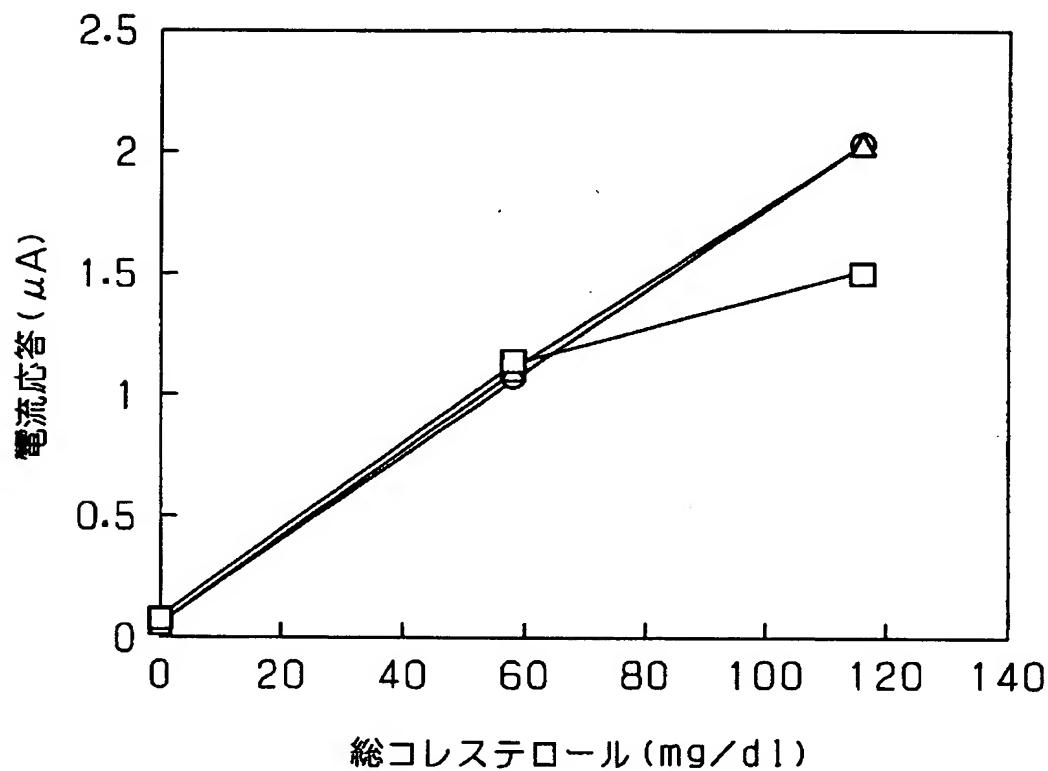
【図1】



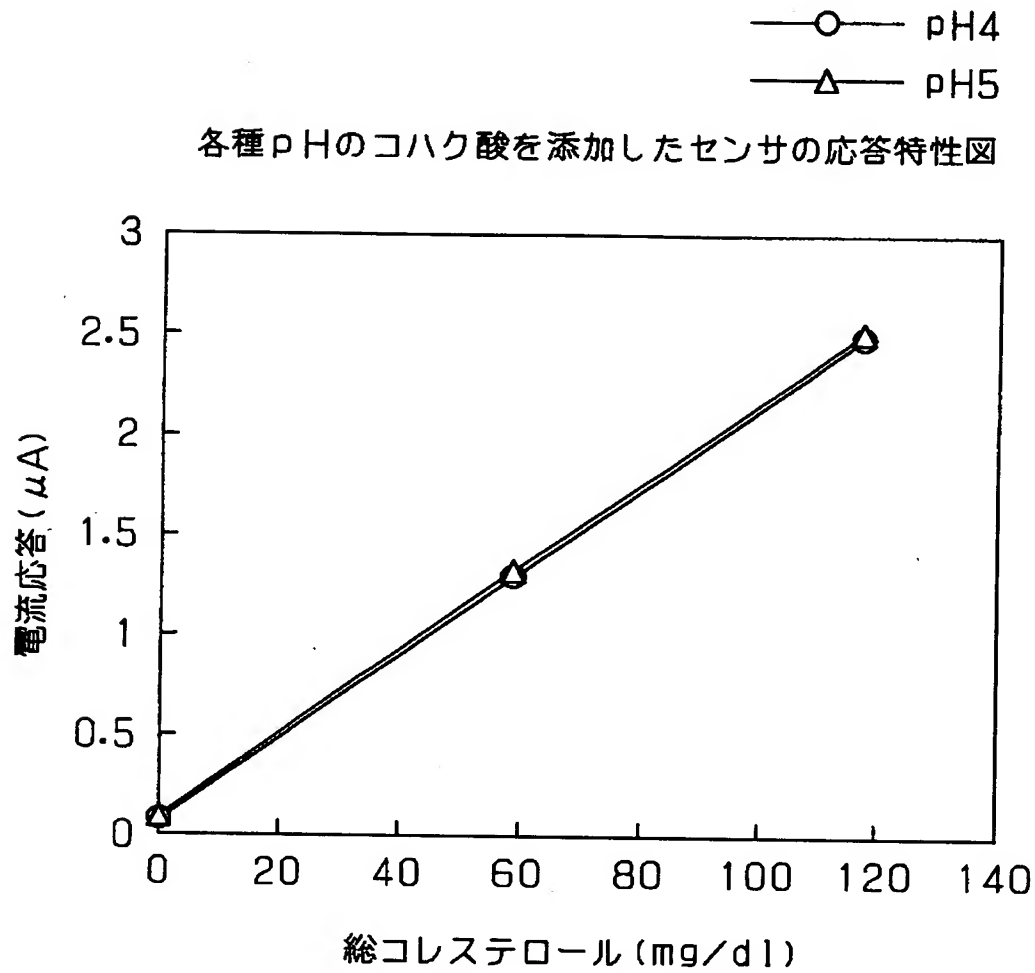
【図2】

—○— pH5
—△— pH6
—□— pH7

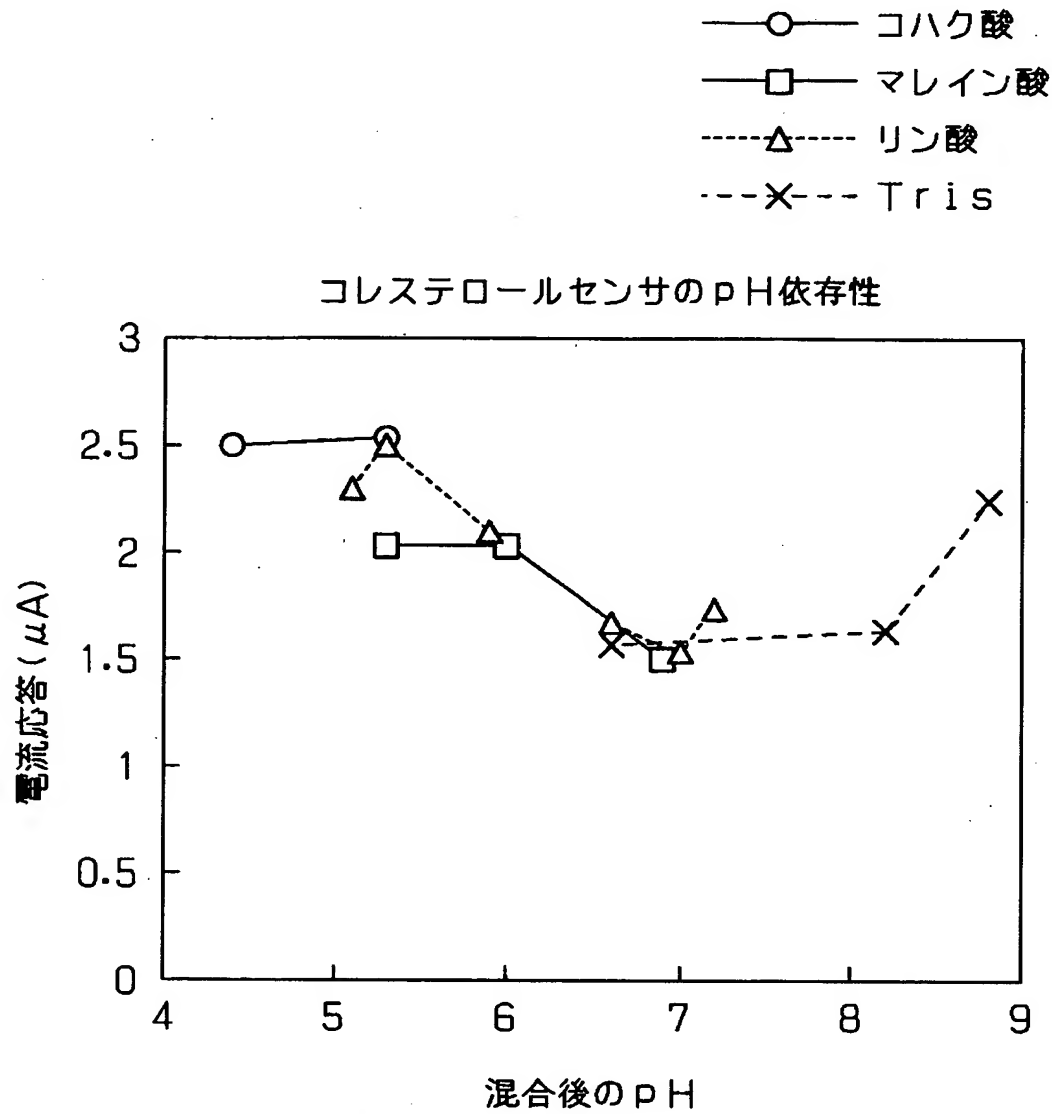
各種pHのマレイン酸を添加したセンサの応答特性図



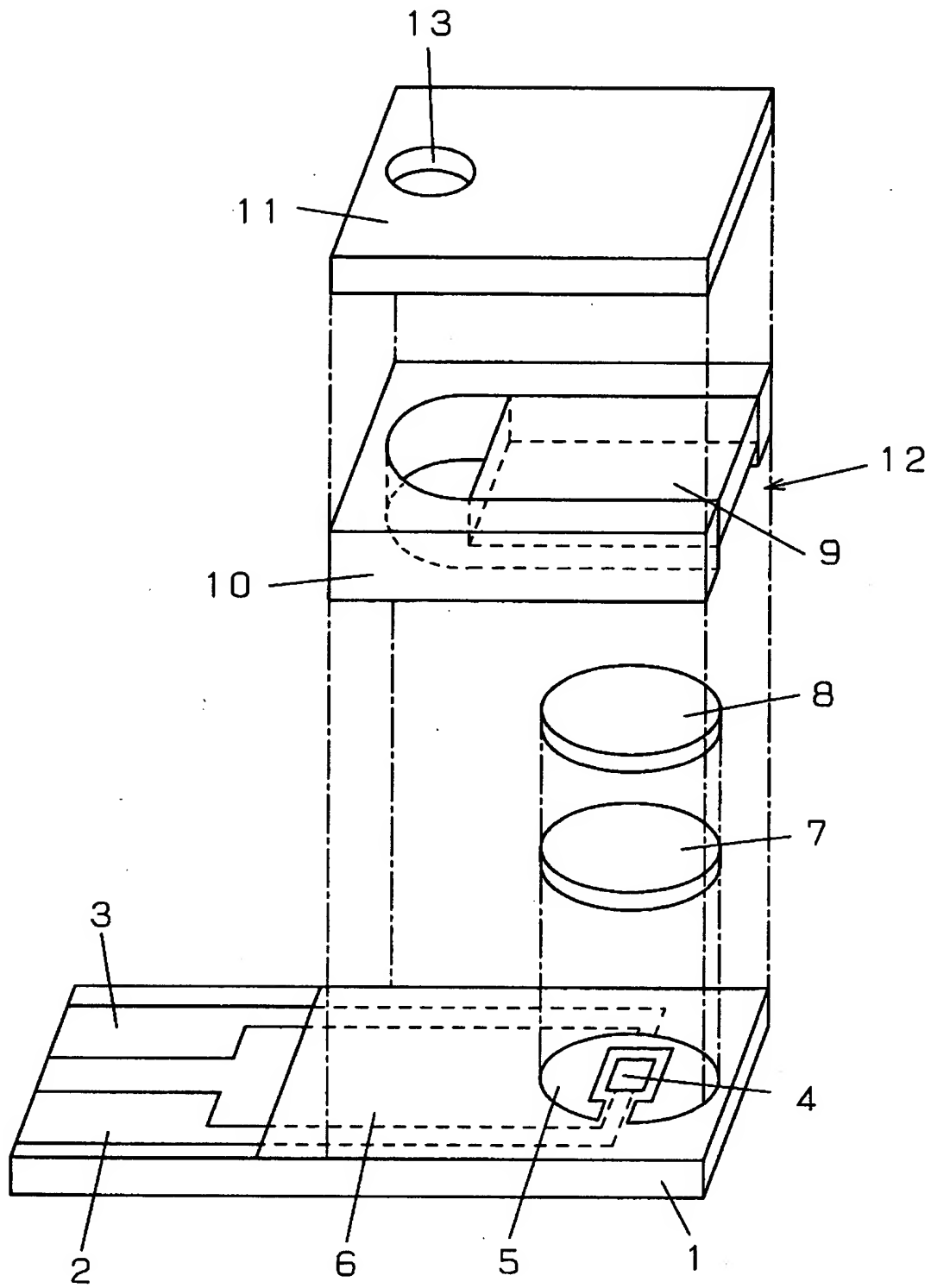
【図3】



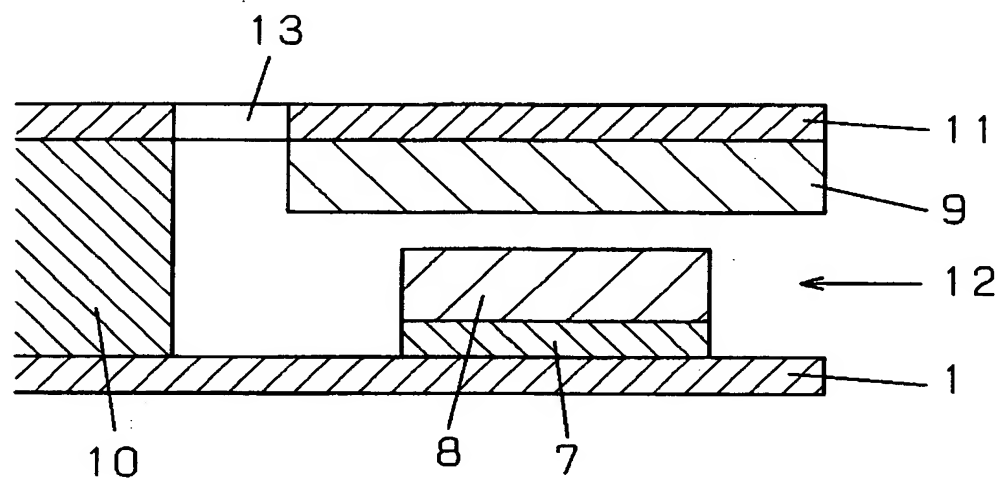
【図4】



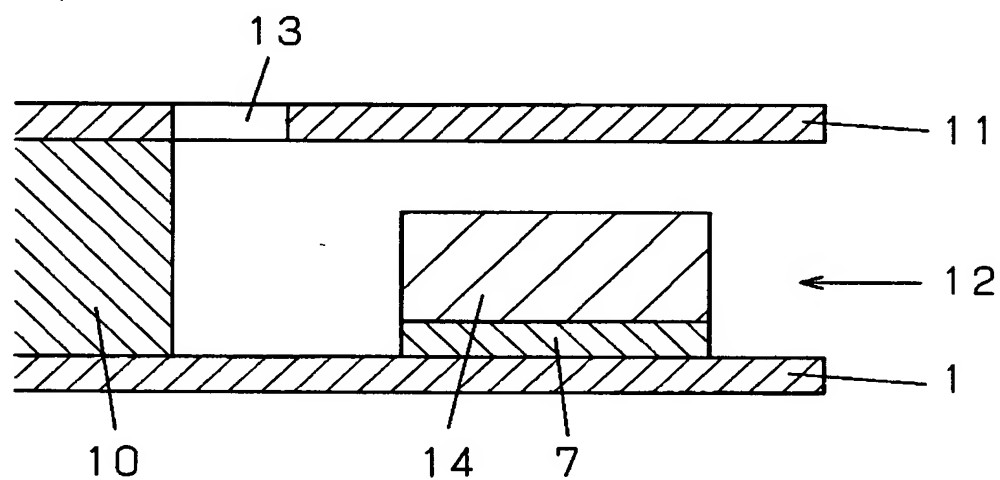
【図5】



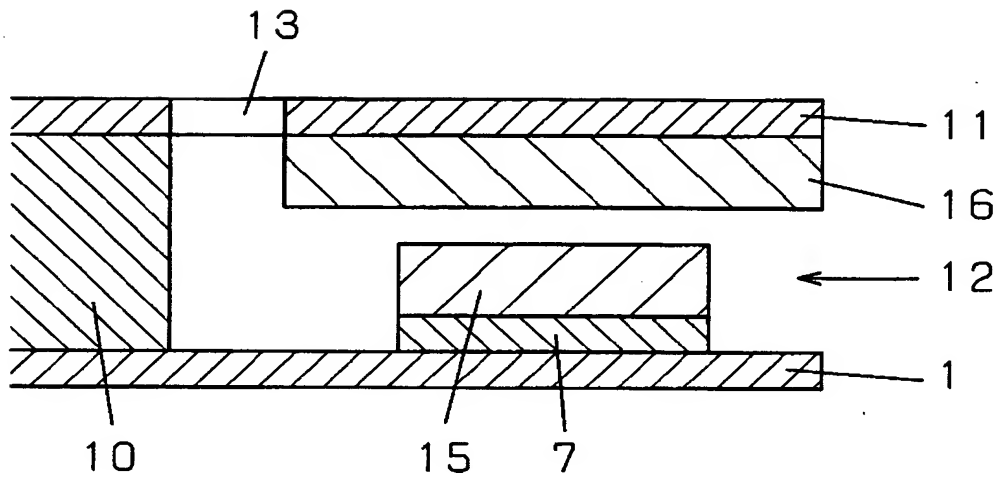
【図6】



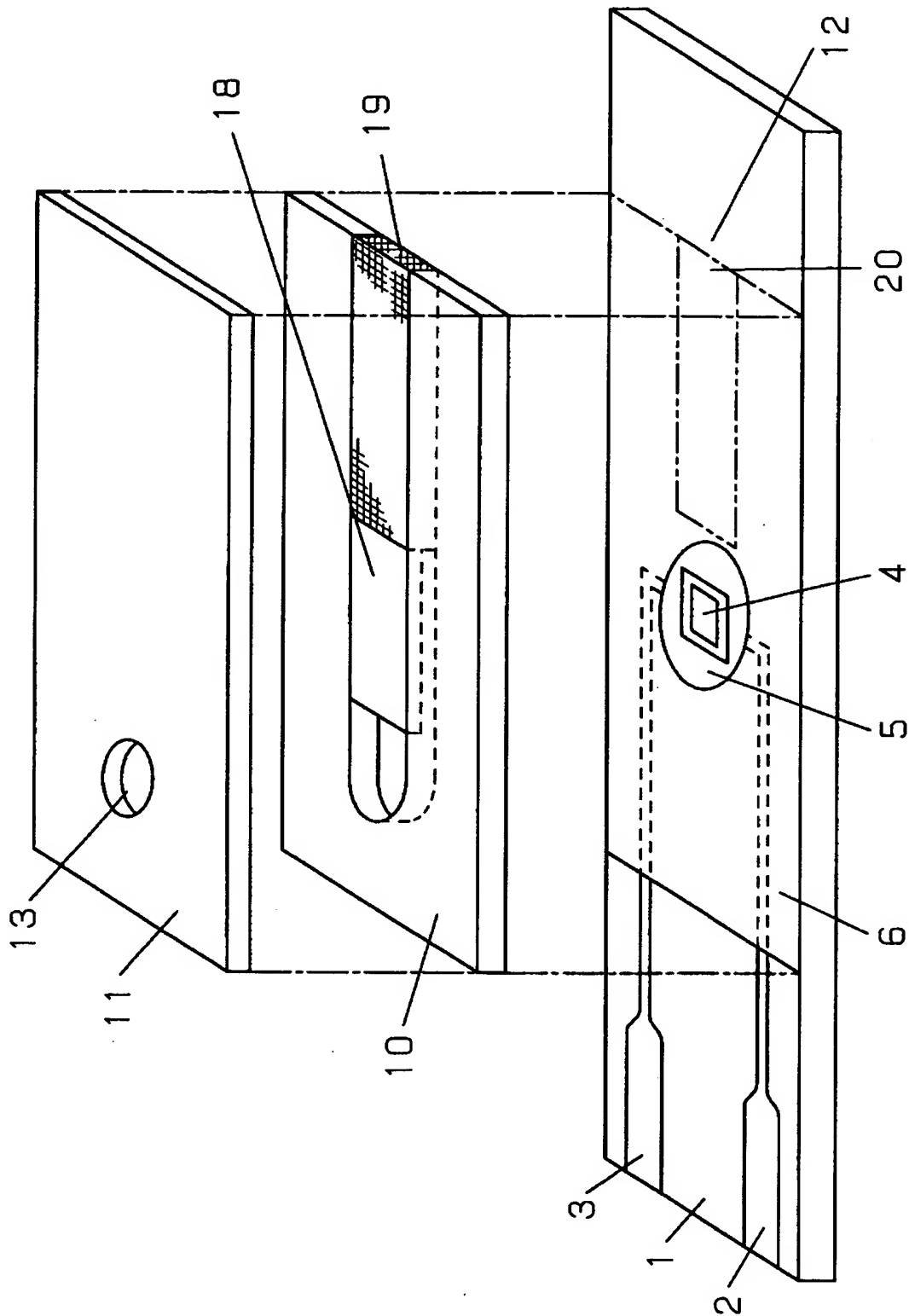
【図7】



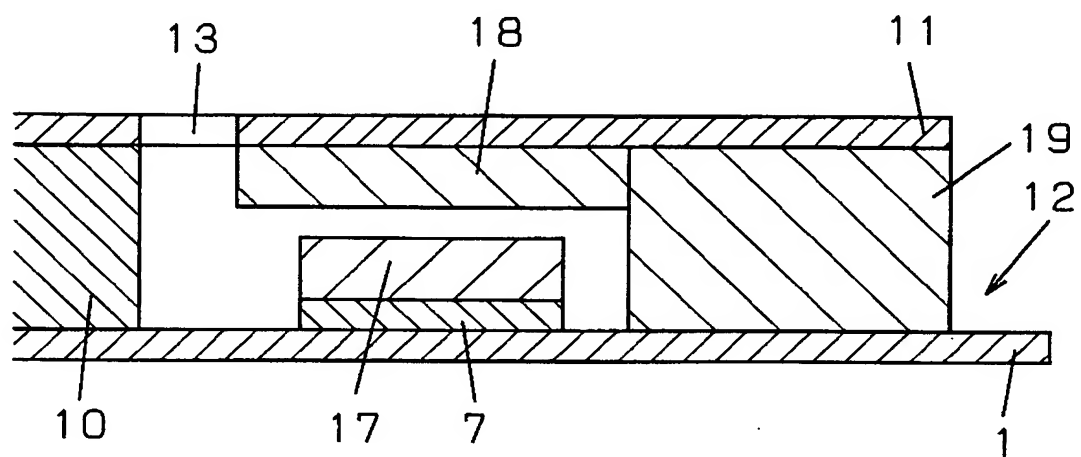
【図 8】



【図9】



【図10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高い応答性を有する、コレステロール酸化酵素およびコレステロールエステラーゼを含むバイオセンサを提供する。

【解決手段】 絶縁性の基板 1 上に形成された測定極 4 と対極 5 とを含む電極系、前記電極系上に形成された親水性高分子層 7、および前記基板 1 上に設けられ、前記基板 1 上に試料供給路および試料供給口 1 2 を形成するカバー部材を含むバイオセンサであって、前記試料供給路内にコレステロール酸化酵素、コレステロールエステラーゼ、電子メディエータ、および pH 緩衝剤を含み、前記 pH 緩衝剤の pH が酸性であることを特徴とするバイオセンサ。

【選択図】 図 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005821]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府門真市大字門真1006番地
氏 名	松下電器産業株式会社